



ABORDAJE *IN SILICO* PARA LA EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS PROVENIENTES DE α-LACTALBÚMINA

ANTONELLA ALBA

Tesina de graduación para la obtención del título de Licenciada en Bioquímica Febrero de 2022 UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE CIENCIAS

> Tutora: Dra. Margot Paulino Zunini Co-tutora: Dra. Alejandra Medrano Fernández

Centro de Bioinformática del DETEMA, Facultad de Química

Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

A Margot Paulino, por abrirme las puertas de su laboratorio, formarme y ayudarme a encontrar mi rumbo. Gracias por apoyarme siempre.

A Pablo Denis, por su apoyo y orientación.

A mis compañeros Jorge Cantero, Andrés Ballesteros, Anabela Martínez, Agustina Nardó y Romina Medeiros, por toda su ayuda, enseñanzas y los momentos compartidos.

A Alejandra Medrano, Jessica Báez y Adriana Fernández, por su buena disposición, dedicación, y paciencia. Aprendí mucho con ustedes.

A Alexandra Elbakyan por remover las barreras en el camino de la ciencia.

En un sentido más amplio y pensando en el recorrido del grado, que en mi caso fue largo y que culmina con este trabajo, agradezco también a tod@s l@s docentes que me formaron y me ayudaron a mantener vivo el amor que motiva mi afán de entendimiento del universo. Siempre voy a recordar el día en el que cursando Fisicoquímica Moderna leí el primer artículo de Bioinformática Estructural de mi vida. No entendí mucho, pero supe que era eso lo que quería estudiar.

A mis ex compañer@s de trabajo, en particular a Cecilia Negro, me incentivó a continuar con la licenciatura, me rezongaba si la descuidaba y estuvo ahí para mí más allá de lo profesional, en particular en momentos difíciles. Gracias por ayudarme a creer que se puede tener una profesión que te haga feliz. A Lucía Fiestas, que me apoyó en retomar la carrera, no desmotivarme en el camino, y decantarme por hacer una gran apuesta en esta dirección. Gracias por ayudarme a encontrar el valor para hacerlo.

A Agustina Arana, sin vos esto no habría sido posible. Gracias por acompañarme en las buenas y en las que no lo fueron tanto, tenerme tanta paciencia, sacar lo mejor de mí y ayudarme a encontrarme en todos los sentidos.

A mis amigos, la familia que elegí y elijo, por estar siempre ahí, tanto en lo que abarca la vida toda como en el estudio. Nos las ingeniamos para preparar exámenes en conjunto hasta no haciendo ni siquiera las mismas carreras. Gracias por enseñarme que no tengo que enfrentar todo sola.

A mi madre, la mejor maestra que la vida podía darme, alegre, optimista, compañera, cariñosa y perseverante. Gracias por enseñarme a tener fe, elegir mi camino, luchar por mis convicciones y ser dueña de mis decisiones. Gracias por enseñarme desde muy temprana edad a caerme, llorar, reírme y levantarme.

A vos, lector/a.

ÍNDICE

Resumen	04
Introducción	05
Hipótesis	13
Objetivos	14
Materiales y Métodos	15
Resultados y Discusión	17
Conclusiones	36
Bibliografía	37
Anexos	42

RESUMEN

Tres péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis y posterior simulación de la digestión gastrointestinal de a-lactoalbúmina fueron estudiados para correlacionar propiedades estructurales У fisicoquímicas con potenciales actividades antioxidantes y IWCKDDQNPH (P1), KFLDDDLTDDIM (P2) antihipertensivas. Los péptidos y DKFLDDDLTDDIM (P3) tienen carga negativa global y son hidrofílicos. Después de modelarlos, se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular para estudiar su espacio conformacional. P1 adoptó cierta estructura secundaria parcial (alfa hélice), mientras que P2 y P3 muestran una distribución extendida. Las estructuras, simuladas en forma solvatada, fueron estudiadas en cuanto a sus superficies accesibles al solvente. P1, P2 y P3 exponen cargas negativas al solvente, y esta información es consistente con el índice GRAVY, también evaluado. Otras características evaluadas fueron la capacidad de penetración celular (mediante el predictor CCPred) y la vida media (mediante el predictor PLifePred). Estudios DFT fueron llevados a cabo para estudiar la capacidad antioxidante. Para el análisis por Teoría del Funcional de Densidad (DFT) se emplearon funcionales de densidad de clase M06. En particular M06-L, adecuado para el estudio de interacciones no covalentes. El conjunto de base empleado fue 6-31G*. De acuerdo a los resultados obtenidos cabría esperar capacidad antioxidante para P1, que presenta en su secuencia Triptófano. Esto es coherente con los resultados obtenidos experimentalmente por los métodos ORAC, HORAC y ABTS. Con la finalidad de evaluar la capacidad antihipertensiva de P1, P2 y P3 se realizaron estudios de anclaje molecular en la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), observándose que P1 entabla más interacciones con el sitio activo de ECA.

Palabras clave: péptidos bioactivos, efecto antihipertensivo, Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), efecto antioxidante, dinámica molecular (MD), Density Functional Theory (DFT).

Antonella Alba Tesina de graduación

INTRODUCCIÓN

Se entiende por péptidos bioactivos aquellos que resultan de la hidrólisis de proteínas presentes en alimentos y que tienen algún efecto considerado benéfico en la salud humana.

Estos efectos pueden ser variados (antihipertensivos, antioxidantes, hipocolesterolémicos), y son deseables, ya que las Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT) son causa del 71% de las defunciones a nivel mundial [1]. Por lo tanto es relevante la identificación y caracterización de péptidos provenientes de alimentos que promuevan los efectos mencionados.

En este trabajo se considerarán péptidos derivados del suero lácteo, residuo que se obtiene del proceso de elaboración del queso, y que es una potencial fuente de péptidos bioactivos.

Según resultados reportados [2], y otros aún no publicados del equipo de Medrano, los péptidos se obtuvieron partiendo de un hidrolizado de α -lactoalbúmina con 0.1 % m/m de enzima alcalasa (proteasa) (2.4 U/g, Anson Units), y sometiéndolo a las condiciones de digestión gastrointestinal mediante un proceso estandarizado. Para identificar los péptidos presentes, el digerido fue analizado por cromatografía y en función de los resultados las fracciones con mayor actividad antioxidante y antihipertensiva fueron analizadas por espectrometría de masas. Los péptidos mayoritarios de las fracciones con mayor actividad turo sintetizados.

Las secuencias correspondientes a estos péptidos serán analizadas en este trabajo, así como los resultados de actividad antioxidante [2] y antihipertensiva obtenidos por Medrano et al.

Las secuencias de los péptidos se ven representadas en la Figura 1 en la posición que ocupan en la α-lactalbúmina, previa digestión y son las siguientes: IWCKDDQNPH, KFLDDDLTDDIM, DKFLDDDLTDDIM. En la Figura 2. se muestra la estructura que presentan en la α-lactalbúmina.

5



Figura 1. Secuencia de α -lactalbúmina de *Bos taurus* (PDB ID: 1F6S) la secuencia de P1 (I₅₉WCKDDQNPH₆₈) y la P3 (D₇₈KFLDDDLTDDIM₉₀) se muestran en recuadros. (La secuencia de P2 (K₇₉FLDDDLTDDIM₉₀) está contenida en P3.) Figura generada con MOE.



Figura 2. Representación tridimensional de los péptidos P1(I_{59} WCKDDQNPH₆₈), en verde y P3 (D₇₈KFLDDDLTDDIM₉₀), en amarillo, tal cual existen en la α -lactalbúmina (*Bos taurus*), en azul. Se evidencian los átomos que componen sus aminoácidos terminales y la estructura secundaria que adopta la región. (La secuencia de P2 (K₇₉FLDDDLTDDIM₉₀) está contenida en P3). (PDB ID: 1F6S, Res: 2.2Å). Figura generada con MOE.

Al observar los péptidos obtenidos, es relevante tener en mente cuál proteasa se empleó para la hidrólisis y cuáles son sus características. La alcalasa es una serin proteasa con actividad óptima a pH alcalino muy utilizada para digestiones por presentar poca especificidad por sitios de corte y permitir la obtención de gran cantidad y diversidad de fragmentos [3].

Posteriormente se volvió a estudiar la actividad antihipertensiva (por ensayo de inhibición de ECA) y antioxidante (por ORAC, HORAC y ABTS) esta vez no de las fracciones sino de los péptidos seleccionados [4].

En base a todo lo mencionado, se realizará un abordaje *in silico* partiendo de la premisa de que el mismo ayudará a conocer y comprender las bases moleculares de la bioactividad de los péptidos obtenidos a partir de α -lactalbúmina.

Efecto antihipertensivo

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), es una metaloproteasa con función dipeptidil carboxipeptidasa [5] perteneciente al clan MA, subclan MA(E), familia M2. Como tal presenta el dominio HEXXH de unión al zinc. Tiene la particularidad de ver su actividad afectada por la presencia de aniones cloruro [5]. Es una proteína transmembrana tipo I y se encuentra en células endoteliales vasculares (en especial pulmonares) participando en el control de la presión arterial por medio del sistema Renina-Angiotensina (RAS). ECA de cataliza la conversión Angiotensina L (Ang I), decapéptido (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) que se origina como producto de la hidrólisis de la Angiotensina (AGT) por medio de la Renina) en Angiotensina II (Ang II). Ang II es un octapéptido (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) cuya unión a receptores acoplados a proteína G y posterior cascada de señalización tiene como consecuencia la vasoconstricción, lo que aumenta la presión arterial [6]. Por esta razón inhibidores de ECA son deseables como fármacos antihipertensivos. ECA contiene dos dominios homólogos (N y C) cada uno con un sitio activo con aproximadamente 60% de identidad [5] siendo el sitio activo del dominio C el que presenta mayor selectividad por Angl como sustrato [7]. El producto de la hidrólisis de Angl por ECA, Angll, es a su vez inhibidor selectivo del dominio C. Esta inhibición por producto es relevante fisiológicamente, pues Angll es un potente vasoconstrictor [7].

A pesar de la diferencia en la selectividad de los dos dominios, el diseño de antihipertensivos poco específicos frecuentemente lleva a que inhiban tanto un sitio como el otro. Mientras que la inhibición del dominio C genera el efecto deseado, la inhibición del dominio N conlleva a la acumulación de bradicinina en los pulmones, trayendo esto efectos indeseables para la salud [8].

ECA existe *in vivo* tanto en forma anclada a membrana, en células del endotelio pulmonar principalmente, como soluble, en la sangre. La región linker que une al dominio N y el C es desestructurada (Figura 3) y por lo tanto no existen a la fecha estructuras cristalográficas de ECA completa.



Figura 3. Modelo de ECA generado por AlphaFold (9) (UniProt ID: P12821). La variación en colores representa la confiabilidad del modelo, en azul oscuro las zonas en las que el modelo es más confiable, en naranja las zonas menos confiables.

Por esto, y por el efecto antihipertensivo ya mencionado de la inhibición del dominio C de ECA (Figura 4a), es que la evaluación de la interacción con los péptidos seleccionados se llevará a cabo sobre el sitio activo de la subunidad C de la ECA somática humana (Figura 4b).



Figura 4. a) Representación 3D de ECA (PDB ID: 1086) b) Sitio activo de ECA. Incluye, Zn, His³⁸³, e His³⁸⁷, Glu⁴¹¹, Glu³⁸⁴, y una molécula de agua cristalográfica.

Los inhibidores farmacológicos empleados a la fecha (captopril, lisinopril, enalaprilat) contienen grupos cargados y actúan todos por interacciones electrostáticas a nivel del Zn²⁺. La inhibición por acción de péptidos no tendría por qué tener el mismo mecanismo [7]. En cuanto al sitio activo de la subunidad C de ECA, contiene un Zn, que coordina con dos histidinas, His³⁸³, e His³⁸⁷ y un glutamato, Glu⁴¹¹. Además se encuentra presente otro glutamato, Glu³⁸⁴, cuyo carboxilo terminal coordina con una molécula de agua cristalográfica (Figura 4.b). Según el mecanismo de acción propuesto, la molécula de agua del sitio activo actuaría como nucleófila, atacando al carbono carbonílico del enlace peptídico que une a la Phe con la His en Angl. En lo que refiere a las interacciones ECA-péptidos relevantes, Ala³⁵⁶ y Tyr⁵²³ contribuirían a estabilizar [7], y Glu³⁸⁴ podría o no interactuar (Figura 5).



Figura 5. Sitio activo en turquesa. Incluye, Zn, His³⁸³, e His³⁸⁷, Glu⁴¹¹, Glu³⁸⁴, y una molécula de agua cristalográfica. Aminoácidos relevantes para la interacción ECA–péptidos según bibliografía en amarillo (Ala³⁵⁶ y Tyr ⁵²³).

Efecto antioxidante

Es sabido que la actividad antioxidante de los péptidos se ve afectada por características estructurales como la composición aminoacídica, el tamaño o la masa molecular [10]. Los péptidos que contienen aminoácidos con electrones susceptibles de ser compartidos pueden actuar neutralizando radicales libres o reduciendo cationes metálicos [11-13]. Proporciones elevadas de Alanina, Leucina y Prolina, de aminoácidos aromáticos como Triptófano, Fenilalanina y Tirosina, así como la presencia de Histidina, se han asociado a la capacidad de neutralización de radicales libres por transferencia directa de electrones [10]. En el caso de la Histidina, que también es capaz de quelar metales, la actividad antioxidante está asociada al anillo imidazol.

El mecanismo por el que esta capacidad antioxidante tiene lugar puede ser, la transferencia de un átomo de hidrógeno, HAT (Hydrogen Atom Transfer) o la transferencia de un electrón SET (Single Electron Transfer) del compuesto antioxidante a un radical, tal cual se ilustra en la Figura 5.

Hydrogen Atom Transfer (HAT) $A-H + X^{\bullet} \longrightarrow A^{\bullet} + X-H$

Single Electron Transfer (SET) $A-H + X^{\bullet} \rightarrow X^{\circ} + A-H^{\circ \bullet} \rightarrow X-H + A^{\bullet}$

Figura 5. Mecanismos de acción antioxidante.

A su vez, estos mecanismos por los que se ejerce la capacidad antioxidante pueden evidenciarse por diferentes ensayos que la evalúan. Así, compuestos que muestran capacidad antioxidante por el método ORAC o HORAC (cuyas características se detallarán en la sección Resultados y Discusión) ejercerán su función antioxidante por el mecanismo HAT y compuestos que muestran capacidad antioxidante por ABTS podrán ejercerla tanto por el mecanismo HAT como SET.

Las cadenas laterales aromáticas pueden participar tanto en reacciones de transferencia directa de electrones (ET) como en la transferencia de átomos de Hidrógeno (HAT) [11, 14]. Además del largo de la cadena, la composición y la secuencia, la ubicación de los aminoácidos en el péptido es relevante [15]. La presencia de Tirosina y Metionina como grupos C-terminales y la de Triptófano y Tirosina como N-terminales incrementaría la capacidad antioxidante de los péptidos [16]. Se ha reportado buena capacidad

Antonella Alba Tesina de graduación antioxidante en secuencias que incluyen, Prolina, Histidina, o Tirosina y aminoácidos hidrofóbicos como Valina y Leucina en la región N-terminal. La Prolina, por su peculiaridad estructural de presentar la cadena lateral asociada a la principal, tiende a cambiar la estructura secundaria del péptido y eso podría incrementar la disponibilidad de los residuos circundantes para que actúen como antioxidantes [17].

Los motivos, Leucina y Serina/Leucina o Treonina y Leucina o Prolina y Leucina, en particular en extremos N y C-terminales, incrementan la actividad de scavenging [18].

HIPÓTESIS

Siendo que la estructura molecular se vincula con la función, se toma como hipótesis que el efecto antioxidante de los péptidos estará relacionado con su estructura electrónica y que el efecto antihipertensivo lo estará con su estructura tridimensional, la que determinará las interacciones en el sitio activo de la Enzima Convertidora de Angiotensina.

OBJETIVOS

Caracterización fisicoquímica y estructural de los péptidos.

Evaluación del efecto antihipertensivo por estudios de anclaje molecular en el sitio activo de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).

Evaluación del efecto antioxidante por estudios DFT (Density Functional Theory).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Secuencias peptídicas

- 1- IWCKDDQNPH
- 2- KFLDDDLTDDIM
- 3- DKFLDDDLTDDIM

Estructura cristalográfica de la enzima

Estructura cristalográfica obtenida del Protein Data Bank, PDB ID: 1086

Hardware

1 estación de trabajo con Sistema Operativo: Linux Mint. CPU Intel(R) Core(TM) i7-2600 CPU 3.40GHz. Graphic Processor Unity GeForce GTX480. HD: 1TB.

Software

MOE 2015 (19), NAMD 2017 (20), VMD 1.9.4 (21), Gaussview5 (22) y Gaussian09 (23).

Métodos

Los métodos empleados fueron simulaciones por Dinámica Molecular (MD), Docking, y Density Functional Theory (DFT).

Las estructuras 3D de cada péptido se generaron y refinaron con MOE usando como campo de fuerza AMBER 12 en todos los procesos.

La minimización de energía se evaluó en fase acuosa con Na⁺ and Cl⁻ como contraiones a 0.1mM y 310K, con un gradiente de 0.01 kcal/mol. Para hacer un estudio conformacional de los péptidos en solución se llevaron a cabo Dinámicas Moleculares de 50 nanosegundos (ns) de los péptidos en fase acuosa para explorar sus posibles conformaciones una vez determinada su estructura 3D usando NAMD.

Posteriormente se realizó un docking (induced fit) de los péptidos en las conformaciones obtenidas a los 50ns de simulación en el sitio activo de ECA y se evaluaron las mejores poses.

Propiedades fisicoquímicas como la carga neta a pH fisiológico, el punto isoeléctrico, y las Superficies Accesibles al Solvente (ASAs Accessible Surface Areas), fueron evaluadas usando el software MOE2015 (19).

Para complementar propiedades fisicoquímicas, evaluó la las se hidrofobicidad/hidrofilicidad de los péptidos mediante el índice GRAVY (24), la capacidad de ingresar a las células empleando el predictor CPPred (25), PLifePred (26) para estimar su vida media y la citotoxicidad asociada con ToxinPred (27). El índice GRAVY para un péptido o proteína muestra una correlación entre el signo de este indicador y la hidrofobicidad e hidrofilicidad. Así, para un índice negativo se esperaría una proteína o péptido hidrofílico y viceversa (28). Usando MOE se calcularon diferentes descriptores moleculares. En la bibliografía existen un gran número de ellos (29). Los descriptores que fueron considerados relevantes para este trabajo y que por lo tanto fueron evaluados fueron, el área superficial accesible al solvente (agua) (Accessible Surface Area: ASA), el área superficial accesible de todos los átomos cargados positivamente (ASA⁺), el área superficial accesible de todos los átomos cargados negativamente (ASA-), el área superficial accesible de los átomos hidrofóbicos (ASA H), y el área superficial accesible de los átomos polares (ASA P). ASA ha sido un descriptor útil para evaluar las energías de solvatación de moléculas pequeñas y péptidos (30). Para las moléculas acuosas se asumió un radio de 1.4 Å. Además, toda la superficie se consideró simultáneamente disponible para la solvatación. Dado que las interacciones entre el agua y los sitios polares son mucho más fuertes que las interacciones entre el agua y los sitios no polares, una molécula de agua unida por un enlace de hidrógeno a un sitio polar puede inhibir que otras moléculas de agua se aproximen a sitios no polares y por lo tanto, en un cálculo teórico, ASA P estará subestimado y ASA H sobrestimado con respecto a lo que serían estas superficies en la realidad.

Las optimizaciones de geometría (en vacío) se calcularon a nivel DFT, empleándose funcionales de densidad de clase M06. En particular M06-L, adecuado para el estudio de interacciones no covalentes (31). El conjunto de base empleado fue 6-31G*. Las estructuras de partida fueron las resultantes de las Dinámicas Moleculares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades fisicoquímicas generales de péptidos de suero.

En la Tabla 1 se destacan los principales resultados de Medrano *et al,* de actividad antioxidante [2] y antihipertensiva de los péptidos.

La actividad antioxidante fue evaluada por los métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), HORAC (HydrOxyl Radical Antioxidant Capacity) y ABTS (también conocido como TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Los tres son métodos *in vitro* que buscan cuantificar la capacidad antioxidante. El principio básico que siguen las tres metodologías es generar radicales libres. En ORAC, derivados de peroxilo, en HORAC, derivados de hidroxilo, y en ABTS, derivados de la oxidación del mismo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); y exponer la muestra con propiedades antioxidantes a ellos. Si la muestra tiene propiedades antioxidantes la concentración de radicales disminuirá, y esto podrá vincularse con la variación de alguna propiedad observable y medible, por ejemplo, cambios en absorbancia, que pueden ser evaluados por espectrofotometría.

La actividad antihipertensiva fue evaluada por ensayo de inhibición de ECA *in vitro*, y se reporta la concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la actividad enzimática.

Péptido	IC ₅₀ ECA (mg/mL)	IC₅₀ ORAC (mg/mL)	IC₅₀ HORAC (mg/mL)	IC₅₀ ABTS (mg/mL)
(1) IWCKDDQNPH	3,91± 0,2	0,015±0,002	1,30±0,05	0,45±0,02
(2) KFLDDDLTDDIM	N/a	0,19±0,03	N/a	N/a
(3) DKFLDDDLTDDIM	N/a	0,18±0,06	N/a	N/a

Tabla 1. Actividad antioxidante según ABTS, ORAC y HORAC y actividad antihipertensiva determinada por inhibición de la enzima ECA, de los tres péptidos. N/a= ausencia de actividad para las concentraciones ensayadas.

De aquí en más los péptidos 1, 2 y 3 serán nombrados como P1, P2 y P3.

Según se reporta en la Tabla 2, P1, P2 y P3 tienen pesos moleculares que oscilan entre los 1 y 1.5kDa con secuencias de entre 10 y 13 aminoácidos. Las cargas netas de P2 y P3 a pH fisiológico son las menores. Estos péptidos difieren únicamente en un aminoácido. P3 tiene un Aspartato extra, por lo tanto, su carga neta será una unidad menor que la carga de P2. La carga neta de P1 también es negativa, pero más próxima a la neutralidad.

Péptido	Nº aminoácidos	Punto isoeléctrico	Carga a pH=7,4	Peso (Da)	GRAVY	Citotoxicidad	Penetración celular	Vida media
1	10	4.94	-1.4	1254	-1.66	no tóxico	0.08	1089.01
2	12	3.39	-4.0	1436	-0.44	no tóxico	0.08	832.41
3	13	3.30	-5.0	1551	-0.67	no tóxico	0.07	834.11

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos y predicciones de citotoxicidad (ToxinPred), índice GRAVY, penetración celular (CPPPred) y vida media (PLifePred). La masa molecular, el punto isoeléctrico, y la carga a pH fisiológico, fueron calculadas con MOE 2015.

Utilizando servidores disponibles, CPPred, PLifePred y ToxinPred, se predijo la capacidad de penetración celular, la vida media y la toxicidad de los péptidos (Tabla 2). Ninguno de los péptidos estudiados sería, de acuerdo con los algoritmos empleados, tóxico a nivel celular, ni tendría la capacidad de penetrar en las células. Con respecto a la vida media, estaría dentro del rango esperable para péptidos.

Los valores de GRAVY fueron calculados para P1, P2 y P3. Los valores obtenidos estuvieron por debajo de cero en todos los casos, lo que indica que son hidrofílicos (Tabla 2). Sin embargo, para P1 el valor obtenido fue aún menor que para P2 y P3. Confirmando que P1 es más hidrofílico que P2 y P3.

Los péptidos analizados tienen una secuencia de entre 10 a 13 aminoácidos. Péptidos de estas dimensiones comienzan a adoptar estructura secundaria [32]. Para estudiar esto, el espacio conformacional de cada péptido fue evaluado mediante Dinámicas Moleculares de 50ns en solución usando NAMD (promedio de las energías totales a lo largo de las dinámicas en Tabla 3). Como resultado pudo observarse la estructura tridimensional que P1, P2 y P3 adoptaron en solución (Figura 6) y predecir su estructura secundaria. Esta predicción empleó asignaciones de estructura secundaria por DSSP [33], el algoritmo incluido en MOE a tales efectos. P2 y P3 adoptaron estructuras de random coil mientras

que P1 adoptó una alfa hélice parcial. Para el caso particular de P1 el resultado es consistente con el valor de GRAVY previamente mencionado, porque es consistente la hidrofilicidad y la formación de una alfa hélice.

En este modelo *in silico* se propone una probable transición a esta estructura de alfa hélice parcial en una solución acuosa en condiciones fisiológicas (0.1mM NaCl a 310K.) Podemos interpretar que el ambiente acuoso va a favorecerlo termodinámicamente.



Figura 6. Representación 3D con MOE mostrando las conformaciones adoptadas por P1 (IWCKDDQNPH), P2 (KFLDDDLTDDIM) y P3 (DKFLDDDLTDDIM) a los 50ns de la simulación. (La región de P1 que adopta la estructura de alfa hélice contiene los residuos KDDQ).

Péptido	Energía (kcal/mol)
P1	-17674,0±63,0
P2	-14163,6±55,6
P3	-15867,6±58,1

Tabla 3. Energía promedio (kcal/mol) para la etapa de producción de la Dinámica Molecular de cada péptido.

Existen reportes en la literatura de que existe una correlación positiva entre la estructura secundaria de los péptidos bioactivos y su actividad biológica [32, 34], aunque poco se sepa sobre este tema.

Las conformaciones finales correspondientes a los 50ns de simulación se presentan a continuación (Figura 7) como superficies moleculares coloreadas según sus propiedades electrostáticas y su lipofilicidad.

P1, P2 y P3 son mayormente hidrofílicos y negativos. Dado que P2 y P3 sólo difieren en un aminoácido, sus superficies son bastante semejantes.

Las regiones hidrofílicas de P1 se ven externas, mientras que las lipofílicas aparecen más localizadas y menos accesibles al solvente, siendo esta observación coherente con los resultados previamente mencionados.



Figura 7. Representación 3D de P1, P2 y P3 (DKFLDDDLTDDIM) a los 50ns de simulación (A) y dos superficies moleculares mostrando la distribución electrostática (B) y la lipofilicidad (C) para cada uno de los tres péptidos estudiados.

Peptido	ASA	ASA⁺	ASA ⁻	ASA_H	ASA_P
1	10754.392	6580.189	4174.202	17.621	10736.771
2	8977.459	5670.978	3306.480	18.719	8958.739
3	9771.751	6125.659	3646.091	34.036	9737.715

Tabla 4. Áreas de Superficie Accesibles (Accessible Surface Areas, Å²) para P1, P2 y P3. Superficies accesibles al solvente (agua) (ASA), ASA de los átomos cargados positivamente (ASA⁺), ASA de los átomos cargados negativamente (ASA⁻), ASA de los átomos hidrofóbicos (ASA_H) y ASA de los átomos polares (ASA_P).

Las Áreas de Superficie Accesibles al solvente (ASAs) fueron calculadas para los tres péptidos (Tabla 4). Como se esperaba, P1 tiene una ASA_P superior a P2 y P3.

A pesar de que P1, P2 y P3 son mayormente negativos a pH fisiológico, tienen más átomos cargados positivamente expuestos a la superficie que átomos con carga negativa.

El creciente interés por la identificación de péptidos bioactivos derivados de fuentes alimentarias (35, 36, 37) ha implicado grandes avances en el área y en consecuencia han surgido múltiples bases de datos (38, 39) que buscan centralizar la información recabada. Dada la importancia de la secuencia primaria para la bioactividad, se analizó la información disponible.

La Tabla 5 incluye todos los péptidos con 8 o más aminoácidos derivados de *Bos taurus* α-lactoalbúmina incluidos en Milk Bioactive Peptides DataBase (MBPDB). (Se aplicó el filtro del número de aminoácidos porque muchos dipéptidos tienen actividad biológica reportada).

Péptido	Intervalo que ocupa en la secuencia de α-lactalbúmina	Función	Referencia
<mark>WL</mark> AHKA <mark>L</mark>	123-129	Inhibidor de ECA	[40]
YGGVSLPEW	37-45	Inhibidor de ECA	[41]
<mark>VG</mark> IN <mark>YWL</mark> AHK	118-127	Inhibidor de ECA	[42]
LK <mark>GYGGV</mark> SLPEW	34-45	Inhibidor de ECA	[41]
K <mark>GYGGV</mark> S <mark>LP</mark> E <mark>W</mark>	35-45	Inhibidor de ECA	[43]
K <mark>GYGGV</mark> S <mark>L</mark>	35-42	Inhibidor de ECA	[43]
GYGGVSLPEW	36-45	Inhibidor de ECA	[40]
DK <mark>VG</mark> IN <mark>YW</mark>	116-123	Inhibidor de ECA	[43]

Tabla 5. Listado de péptidos con 8 o más aminoácidos derivados de *Bos taurus* α-lactoalbúmina incluidos en Milk Bioactive Peptides DataBase (MBPDB). Se indica el intervalo que ocupan en la secuencia de α-lactalbúmina, la función que tienen reportada en la literatura y la referencia donde se reporta. Se resaltan en amarillo G, I, L ó V, aminoácidos cuya presencia en el extremo N-terminal sería indicativa de inhibición de ECA. Se resaltan en naranja P, Y ó W, aminoácidos cuya presencia en el extremo C-terminal sería indicativa de inhibición de ECA.

Como la Tabla 5 muestra, la actividad inhibidora de ECA es una actividad ampliamente extendida para varios péptidos de semejantes características obtenidos de α -lactoalbúmina. Se ha reportado [44] que los aminoácidos terminales son cruciales para la actividad biológica de los péptidos. Para el caso de la inhibición de ECA, la presencia de G, I, L ó V en el extremo N-terminal (en amarillo) y de P, Y ó W para el aminoácido C-terminal (en naranja) son relevantes [45-47]. Lo mencionado tiene excepciones, y pueden verse también en esta tabla, en la que se resaltan en naranja los aminoácidos que cabría esperar encontrar en un extremo terminal de péptidos con actividad antihipertensiva y con amarillo los aminoácidos que cabría esperar encontrar en el otro extremo, y que no en todos los casos ocupan estas ubicaciones. Sin embargo, varios

Antonella Alba Tesina de graduación péptidos obtenidos de α-lactalbúmina comparten estas características. Parecería que para la mayoría de los casos el aminoácido C-terminal debe ser en efecto P, Y ó W y el N-terminal V, I, L ó G. Parecería también, que la presencia de K ó D en el N-terminal no afectaría la actividad inhibitoria de ACE, si son seguidos por varios G, I, L ó V.

P1 ($I_{59}WCKDDQNPH_{68}$) sigue bastante de cerca este patrón, aunque no termina en Pro. De todos modos cabe recordar que este aminoácido tiende modular la estructura secundaria por la peculiaridad estructural de la Pro, que tiene su cadena lateral asociada a la principal, lo que le confiere una flexibilidad conformacional que puede dejarla más expuesta, lo que de hecho sucede y puede observarse en figuras anteriores (ver Figura 5 P2 $(K_{70}FLDDDLTDDIM_{90})$ anteriormente citada). Para el caso de P3 V $(D_{78}KFLDDDLTDDMM_{90})$, presentan Leucina pero no en posiciones terminales. Lo analizado explica sólo parcialmente lo observado, probablemente por la influencia de otros factores adicionales a la estructura primaria en la actividad antihipertensiva. También podría hacerse un análisis más detallado de esta variable contando con mayor cantidad de péptidos reportados en literatura.

En lo que refiere a la actividad antioxidante y el efecto de la secuencia aminoacídica en ella, los aminoácidos terminales también son determinantes. De acuerdo con [48] cambiar LHX (siendo X cualquier aminoácido) por LHW incrementaría significativamente la actividad antioxidante detectada por el método TEAC (ABTS). Para los aminoácidos reportados antioxidantes por ORAC [48] la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (independientemente de su posición) se correlacionaría de forma positiva con esta actividad. Por lo tanto, la presencia de W, Y, I, F, M y L es deseable. De hecho, varios péptidos derivados de la leche reportados en la literatura como antioxidantes [16] comparten estas características.

Dado que la capacidad antioxidante puede deberse también a la tendencia a donar hidrógenos de ciertos aminoácidos, histidina, metionina y cisteína pueden favorecerla [16, 49].

Por lo tanto, cabría esperar que péptidos con W como aminoácido terminal que contengan H, M y C, así como Y, I, F, y L presenten actividad antioxidante.

De los sistemas estudiados, el que cumple en mayor medida con esta premisa es P1 (IWCKDDQNPH), lo que es coherente con los otros resultados presentados previamente. De todas formas, P2 (KFLDDDLTDDIM) y P3 (DKFLDDDLTDDIM) también presentan algunos de estos aminoácidos en sus secuencias.

Estudios in vitro e in silico de péptidos con actividad antioxidante de suero.

De los tres péptidos ensayados, sólo P1 tuvo actividad detectable por los tres ensayos.

P2 y P3 sólo presentaron actividad antioxidante por ORAC. Dentro de estos resultados (Tabla 6), se sigue observando una variación de un orden entre la capacidad antioxidante de P1 versus la de P2 y P3, siendo P1 más antioxidante, y P2 y P3 semejantes.

Con la finalidad de comprender más en profundidad el método por el que esta capacidad antioxidante tiene lugar se emplearon métodos cuánticos. Se muestran en la Figura 8 los orbitales HOMO para los tres péptidos.

El orbital HOMO del P1 se encuentra localizado sobre el aminoácido Trp, lo que implica que es el aminoácido tiene la capacidad a perder un electrón, formando un radical libre, ejerciendo el poder antioxidante analizado.

En lo referente a P2 y P3, que sólo difieren en un aminoácido, el orbital HOMO se sitúa sobre la Met. Esta Met se encuentra en una posición terminal, y está sumamente expuesta al solvente. De acuerdo a la bibliografía esta disposición tendería a incrementar la capacidad antioxidante. Por lo que la capacidad antioxidante que estos dos péptidos presentan podría deberse a la posición de este aminoácido, y la variación con P1, a que P1 presenta un aminoácido aromático.

Los péptidos con Trp en su secuencia pueden ejercer su capacidad antioxidante tanto por HAT como por SET, siendo esto coherente con los resultados experimentales.

A su vez este resultado es consistente con la bibliografía, que reporta a este aminoácido como característico en secuencias de péptidos antioxidantes.

Péptido	IC₅₀ ORAC (mg/mL)	IC₅₀ HORAC (mg/mL)	IC₅₀ ABTS (mg/mL)
(1) IWCKDDQNPH	0,015±0,002	1,30±0,05	0,45±0,02
(2) KFLDDDLTDDIM	0,19±0,03	N/a	N/a
(3) DKFLDDDLTDDIM	0,18±0,06	N/a	N/a

 Tabla 6. Actividad antioxidante según ABTS, ORAC y HORAC de los tres péptidos.



Figura 8. Estructura de los tres péptidos en estudio representada mediante varillas y esferas en gris (carbono), rojas (oxígeno), azules (nitrógeno), amarillas (azufre). Los átomos de hidrógeno no están representados. En particular se detallan los orbitales de frontera HOMO calculados por DFT representados mediante superficies globulares sólidas en verde y magenta. A la derecha de cada figura se menciona sobre qué residuo se encuentra el orbital HOMO. Péptido P1 (a) su orbital HOMO se encuentra sobre el triptófano (IW₆₀CKDDQNPH). P2 (b) (KFLDDDLTDDIM₉₀) y P3 (c) (DKFLDDDLTDDIM₉₀) orbitales HOMO sobre la metionina. En la esquina superior izquierda de cada figura se detalla la secuencia de cada péptido.

Péptido	Gap _{HOMO-LUMO} (eV)
1	4.921
2	4.921
3	5.061

Tabla 7. Gap HOMO-LUMO para los tres péptidos estudiados.

Es relevante considerar en esta discusión las limitantes del abordaje realizado, tanto desde el punto de vista *in vitro* como *in silico*. Desde el punto de vista *in vitro*, el radical ABTS es menos reactivo que los radicales hidroxilo y peroxilo. Además, es repelido por residuos de Lys, y Phe es poco activa contra él. Desde el punto de vista *in silico*, el estudio del orbital HOMO de cada péptido nos dará información sobre la distribución de densidad electrónica que nos permitirá predecir a nivel de qué región de la molécula sería más esperable que pudiera compartirse un electrón.

El gap_{HOMO-LUMO} (Tabla 7) por otro lado, nos dará información sobre la reactividad de la molécula como un todo. Los valores obtenidos para los tres péptidos son semejantes. El gap_{HOMO-LUMO} por sí solo no da información sobre la forma en la que esa reactividad tiene lugar.

Además, la interpretación de estos resultados está enmarcada en el supuesto de considerar que la actividad antioxidante de los péptidos ocurre por el mecanismo Single Electron Transfer (SET), cuando también podría suceder por transferencia de Hidrógeno, Hydrogen Atom Transfer (HAT). Respecto a esto, algunos aminoácidos pueden ejercer acción antioxidante por el mecanismo HAT (Trp, Phe, His), otros por SET (Ala, Leu, Pro, Phe, Trp, Tyr, His). Notar que algunos aminoácidos pueden actuar por uno u otro mecanismo. También, la disponibilidad de esos electrones o hidrógenos para ser transferidos dependerá del entorno del residuo aminoacídico considerado.

Por lo tanto para evaluar en mayor detalle la capacidad antioxidante de estos péptidos deberían llevarse a cabo más estudios, por ejemplo, la energía de disociación de enlace (para HAT) una vez planteado un modelo para este mecanismo.

Estudios *in silico* de anclaje molecular en péptidos de suero inhibidores de la enzima ECA.

Se utilizó como receptor la estructura PDB ID: 1086 de ECA. Se utilizaron como estructuras de ligandos las conformaciones obtenidas de las Dinámicas Moleculares de 50ns efectuadas para cada uno de los tres péptidos. Para los docking efectuados se utilizó MOE 2015.

El sitio de anclaje se construyó seleccionando una esfera de radio 9,0 Å centrada en el sitio activo (Fig. 4.b) y extendiendo la selección a los residuos de ECA cuyos átomos quedaron seleccionados en la esfera.

El posicionamiento de los ligandos se realizó utilizando el ajuste inducido (*Induced fit*) que permite la movilidad (flexibilidad) de las cadenas laterales incluidas en la esfera y con un método de colocación *Alpha PMI* (utiliza alfa esferas del receptor y al ligando lo representa a través de sus momentos principales de inercia). La medida del ajuste (Score, expresada en kcal/mol) se obtuvo con la función de puntuación *affinity delta G* (19), parametrizada para expresar el resultado como energías de interacción.

El modo de unión se analizó considerando los scores obtenidos (Tabla 8) para las diferentes poses y analizando gráficamente los enlaces no covalentes establecidos en los complejos péptido-ligando.

Posteriormente se analizaron las interacciones moleculares presentes. El análisis PLIF (Protein-Ligand Interaction Fingerprints) [19] (Figuras 10, 11 y 12) permite hacer un estudio poblacional de las interacciones. Conociendo las interacciones que sería deseable entablar en base al conocimiento del sitio activo y modo de acción de la enzima, se discute para cada péptido las poses que incluían estas interacciones. A saber, interacciones electrostáticas con His³⁸³, His³⁸⁷, Glu⁴¹¹ y Zn²⁺. Cabe mencionar que como fue discutido en la introducción, la interacción con Glu³⁸⁴ y con el Zn²⁺ pueden no estar presentes en este sistema (ECA-péptido) sin que eso implique que los péptidos no ejerzan actividad antihipertensiva pues otras interacciones pueden estabilizarlos, siendo ejemplo de esto interacciones con los residuos Ala³⁵⁶ y Tyr⁵²³ (ver fig. 5).



Figura 10. Análisis poblacional de interacciones Proteína-Ligando (PLIF) para P1 representado en forma de histograma. La numeración corresponde a los residuos de ECA con los que interacciona P1, la altura de cada barra a la cantidad de poses predichas por el anclaje que entablarían dicha interacción, y la cantidad de barras a los diferentes tipos de interacciones que son entabladas con el residuo. El Zn²⁺ no figura anotado al pie, pero está representado en color turquesa entre Tyr⁵²³ y el agua.



Figura 11. Análisis poblacional de interacciones Proteína-Ligando (PLIF) para P2 representado en forma de histograma. La numeración corresponde a los residuos de ECA con los que interacciona P2, la altura de cada barra a la cantidad de poses predichas por el anclaje que entablarían dicha interacción, y la cantidad de barras a los diferentes tipos de interacciones que son entabladas con el residuo. El Zn²⁺ no figura anotado al pie, pero está representado en color turquesa entre Tyr⁵²³ y el agua.





Figura 12. Análisis poblacional de interacciones Proteína-Ligando (PLIF) para P3 representado en forma de histograma. La numeración corresponde a los residuos de ECA con los que interacciona P3, la altura de cada barra a la cantidad de poses predichas por el anclaje que entablarían dicha interacción, y la cantidad de barras a los diferentes tipos de interacciones que son entabladas con el residuo. El Zn²⁺ no figura anotado al pie, pero está representado en color turquesa entre Tyr⁵²³ y el agua.

De las interacciones previamente mencionadas, P1 interactúa mayoritariamente con His³⁸³, His³⁸⁷, Glu³⁸⁴, Glu⁴¹¹, Tyr⁵²³, Ala³⁵⁶, Zn²⁺ y la molécula de agua.

P2 y P3 (sólo difieren en su secuencia en un aminoácido y el patrón de interacciones que presentan es semejante) interactúan mayoritariamente con His³⁸³, His³⁸⁷, Glu³⁸⁴, Tyr⁵²³, Ala³⁵⁶, Zn²⁺ y la molécula de agua.

De acuerdo a lo obtenido experimentalmente, sólo P1 presenta actividad antihipertensiva

Antonella Alba Tesina de graduación (Tabla 8). Teniendo en cuenta que son péptidos de entre 10 y 14 aminoácidos, la diferencia de afinidad entre los péptidos por el sitio debe estar además determinada por otras interacciones. Lo relevante es observar entonces en qué interacciones difieren P2 y P3 con P1. P1 presenta interacciones con Tyr¹³⁵ y Glu⁴¹¹, mientras que P2 y P3 no. Por otro lado, P1 no presenta interacciones con Glu⁴⁰³ y Lys⁴⁵⁴ mientras que P2 y P3 sí. El que P2 y P3 tiendan a interactuar en mayor medida con residuos polares es coherente con su secuencia.

Otra variable a considerar es la cantidad y tipo de interacciones que los péptidos entablan con un residuo específico. Una diferencia que en este sentido salta a la vista está a nivel de las interacciones con el Zn^{2+} . P2 y P3 interactúan en mucha mayor medida con él de lo que lo hace P1. Según fue mencionado en la introducción, si bien este metal se encuentra en el centro de reacción, la inhibición de ECA mediante péptidos no tendría que involucrarlo necesariamente. Los fármacos empleados como antihipertensivos interactúan directamente con el Zn^{2+} , pero AngII, que es un péptido, no. Por lo tanto sería más esperable que P1, P2 y P3, por ser péptidos al igual que AngII, actuaran de modo semejante a ella.

La misma lógica aplica al agua, que podría ser desplazada del sitio.

Péptido	IC ₅₀ (mg/mL)	Docking Score Induced Fit (kcal/mol)
P1	3,91± 0,2	-18.89
P2	N/a	-19.35
P3	N/a	-20.81

Tabla 8. Inhibición de ECA por P1, P2 y P3 in vitro e in silico



Figura 13. Representación 3D de la pose seleccionada de P1 dockeado en el sitio activo de ECA. Además de los aminoácidos del sitio activo (His³⁸³, His³⁸⁷, Glu³⁸⁴, Glu⁴¹¹ y Zn²⁺ se incluyen Ala³⁵⁶ y Tyr⁵²³, por ser dos aminoácidos considerados relevantes en la bibliografía frente a la interacción ECA-péptido (hidrógenos ocultos). Para mayor claridad en la visualización P1 es representado a partir de su estructura secundaria y se incluyen superficies moleculares. Arriba superficie molecular representando la electrostática (rojo para cargas negativas y azul para cargas positivas). Abajo superficie molecular representando la hidrofilicidad-hidrofobicidad (regiones hidrofílicas en violeta y regiones hidrofóbicas en verde). Para mayor detalle de las interacciones ver representación en 2D de todos los contactos en Anexo (fig. 1).



Figura 14. Representación 3D de la pose seleccionada de P2 dockeado en el sitio activo de ECA. Además de los aminoácidos del sitio activo (His³⁸³, His³⁸⁷, Glu³⁸⁴, Glu⁴¹¹ y Zn²⁺ se incluyen Ala³⁵⁶ y Tyr⁵²³, por ser dos aminoácidos considerados relevantes en la bibliografía frente a la interacción ECA-péptido (hidrógenos ocultos). Para mayor claridad en la visualización P2 es representado a partir de su estructura secundaria y se incluyen superficies moleculares. Arriba superficie molecular representando la electrostática (rojo para cargas negativas y azul para cargas positivas). Abajo superficie molecular representando la hidrofilicidad-hidrofobicidad (regiones hidrofílicas en violeta y regiones hidrofóbicas en verde). Para mayor detalle de las interacciones ver representación en 2D de todos los contactos en Anexo (fig. 2)



Figura 15. Representación 3D de la pose seleccionada de P3 dockeado en el sitio activo de ECA. Además de los aminoácidos del sitio activo (His³⁸³, His³⁸⁷, Glu³⁸⁴, Glu⁴¹¹ y Zn²⁺ se incluyen Ala³⁵⁶ y Tyr⁵²³, por ser dos aminoácidos considerados relevantes en la bibliografía frente a la interacción ECA-péptido (hidrógenos ocultos). Para mayor claridad en la visualización P3 es representado a partir de su estructura secundaria y se incluyen superficies moleculares. Arriba superficie molecular representando la electrostática (rojo para cargas negativas y azul para cargas positivas). Abajo superficie molecular representando la hidrofilicidad-hidrofobicidad (regiones hidrofílicas en violeta y regiones hidrofóbicas en verde). Para mayor detalle de las interacciones ver representación en 2D de todos los contactos en Anexo (fig. 3).

Antonella Alba Tesina de graduación Respecto a las energías de interacción, se tomaron en cuenta como un parámetro indicativo pero no determinante a la hora de elegir una pose representativa del anclaje.

Las observaciones mencionadas pueden verse con más claridad en las Figuras 13-15, poses representativas obtenidas a partir del anclaje (una por péptido), seleccionadas considerando el score obtenido (Tabla 8) y las interacciones entabladas.

CONCLUSIONES

Ninguno de los tres péptidos analizados en este trabajo han sido reportados aún, por lo que incrementarán la información disponible sobre el tema.

El abordaje *in silico* realizado permitió explicar desde el punto de vista fisicoquímico los resultados experimentales obtenidos.

Un análisis más detallado del problema requeriría otros abordajes tanto experimentales como bioinformáticos.

Relativo a la acción antihipertensiva, los resultados de inhibición de la enzima *in vitro* así como los estudios de anclaje, fueron consistentes.

Desde lo bioinformático, podría profundizarse el estudio llevando a cabo dinámicas moleculares de la enzima con cada uno de los péptidos. También, podrían eventualmente hacerse cristalografías que confirmaran las interacciones predichas.

Desde lo experimental queda pendiente la discusión de la biodisponibilidad de estos péptidos, ya que, como fue discutido, siendo hidrofílicos es poco probable que atraviesen membranas.

Relativo a la acción antioxidante, también fue posible relacionar lo obtenido experimentalmente con lo esperado teóricamente. De todas formas, para poder estudiar el caso en más detalle, convendría analizar energías de disociación de enlace, tal cual se discutió en la sección anterior.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) **World Health Organization.** Acceso 10/02/2022. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases.
- (2) Fernández, A., López T., Medrano A. Evaluation of Antioxidant, Antiglycant and ACE-Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of alpha-Lactalbumin. 2017, Food and Nutrition Sciences, 08, 84–98.
- (3) Guérard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., Binet, A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (Thunnus albacares) wastes using Alcalase. 2001, Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 11(4-6), 1051-1059.
- (4) Báez Caballero, J. N., Fernández-Fernández, A. M., Tironi, V., Bollati-Fogolín, M., Añón, M. C., & Medrano-Fernández, A. Identification and characterization of antioxidant peptides obtained from the bioaccessible fraction of 2021, *J Food* 4479α-lactalbumin hydrolysate. Sci., 86. 4490. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15918
- (5) Corradi, H. R., Schwager, S. L. U., Nchinda, A. T., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. Crystal Structure of the N Domain of Human Somatic Angiotensin I-converting Enzyme Provides a Structural Basis for Domain-specific Inhibitor Design. 2006, Journal of Molecular Biology, 357(3), 964–974. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.048
- (6) Fountain JH, Lappin SL. **Physiology, Renin Angiotensin System.** 2017, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- (7) Masuyer, G., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., Isaac, R. E., Acharya, K. R. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. 2012, Scientific reports, 2(1), 1-10.
- (8) Redelinghuys, P., Nchinda, A. T., Chibale, K., & Sturrock, E. D. Novel ketomethylene inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE): inhibition and molecular modelling. 2006, Biological chemistry, 387(4), 461-466.
- (9) Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A., Žídek A., Green T., Tunyasuvunakool K., Petersen S., Jumper J., Clancy E., Green R., Vora A., Lutfi M., Figurnov M., Cowie A., Hobbs N., Kohli P., Kleywegt G., Birney E., Hassabis D., Velankar S., AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural

coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. 2021, Nucleic acids research, 50(D1), D439-D444.

- (10) Ketnawa S., Wickramathilaka M., Liceaga A. M. Changes on antioxidant activity of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. 2018, Food chemistry, 254, 36-46.
- (11) Aluko R. E. Functional foods and nutraceuticals, 37-61. 2012, New York, NY, USA: Springer.
- (12) He R., Ju X., Yuan J., Wang L., Girgih A. T., Aluko R. E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. 2012, Food Research International, 49(1), 432-438.
- (13) Zou T. B., He T. P., Li H. B., Tang H. W., Xia E. Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. 2016, Molecules, 21(1), 72.
- (14) Udenigwe C. C., Aluko R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. 2012, Journal of food science, 77(1), R11-R24.
- (15) Gallego M., Mora L., Toldrá F. Characterisation of the antioxidant peptide AEEEYPDL and its quantification in Spanish dry-cured ham. 2018, Food Chemistry, 258, 8-15.
- (16) Hernández-Ledesma, B. Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α-lactalbumin and β-lactoglobulln. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. 2005, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(3), 588–593.
- (17) Farvin K. S., Baron C. P., Nielsen N. S., Otte J., Jacobsen C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2–characterisation of peptide fractions. 2010, Food Chemitry, 123(4), 1090-1097.
- (18) Ren J., Zhao M., Shi J., Wang J., Jiang Y., Cui C., Kakuda Y., Xue S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. 2008, Food chemistry, 108(2), 727-736.
- (19) Chemical Computing Group Inc., **Molecular operating environment (MOE)**, 2015.

- (20) Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. 2005, Journal of computational chemistry, 26(16), 1781-1802.
- (21) Humphrey W., Dalke A., Schulten, K. **VMD: visual molecular dynamics.** 1996, Journal of molecular graphics, 14(1), 33-38.
- (22) Denninton V., Keith R., Millam T. GaussView Version 5. 2009, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS.
- (23) Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Petersson G. A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A., Bloino J., Janesko B. G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H. P., Ortiz J. V., Izmaylov A. F., Sonnenberg J. L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D., Zakrzewski V. G., Gao J., Rega N., Zheng G., Liang W., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery J. A., Peralta Jr., J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Millam J. M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J. B., Fox D. J., Gaussian 09, Revision A.02. 2009, Gaussian Inc., Wallingford CT.
- (24) Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. 1982, Journal of Molecular Biology, 157(1), 105–132.
- Wei L., Xing P., Su R., Shi G., Ma Z. S., Zou Q. CPPred-RF: a sequence-based predictor for identifying cell-penetrating peptides and their uptake efficiency. 2017, Journal of Proteome Research, 16(5), 2044-2053.
- (26) Mathur D., Singh S., Mehta A., Agrawal P.,Raghava G. P. In silico approaches for predicting the half-life of natural and modified peptides in blood. 2018, PloS one, 13(6), e0196829.
- (27) Gupta S., Kapoor P., Chaudhary K., Gautam A., Kumar R., Open Source Drug Discovery Consortium, Raghava G. P. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. 2013, PloS one, 8(9), e73957.
- (28) Bagag A., Jault M., Sidahmed-Adrar N., Réfrégiers M., Giuliani A., Le Naour F. Characterization of Hydrophobic Peptides in the Presence of Detergent by Photoionization Mass Spectrometry. 2013, PLoS ONE 8(11), e79033.

- (29) Todeschini R., Consonni V. Handbook of molecular descriptors (Vol. 11), 2008, John Wiley & Sons.
- (30) Fleming P. J., Fitzkee N. C., Mezei M., Srinivasan R., Rose G. D. A novel method reveals that solvent water favors polyproline II over β-strand conformation in peptides and unfolded proteins: Conditional hydrophobic accessible surface area (CHASA). 2005, Protein science, 14(1), 111-118.
- (31) Zhao Y., Truhlar D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. 2008, Theoretical chemistry accounts, 120(1), 215-241.
- (32) Wang J., Yin T., Xiao X., He D., Xue Z., Jiang X., Wang Y. StraPep: a structure database of bioactive peptides. 2018, Database.
- (33) Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. 1983, Biopolymers, 22(12), 2577–2637.
- (34) Yuan H., Lv J., Gong J., Xiao G., Zhu R., Li L., Qiu J. Secondary structures and their effects on antioxidant capacity of antioxidant peptides in yogurt. 2018, International Journal of Food Properties, 21(1), 2167-2180.
- (35) Mann B., Athira S., Sharma R., Kumar R., Sarkar P. Bioactive peptides from whey proteins. 2019, Whey proteins, Academic Press, 519-547.
- (36) Amorim F. G., Coitinho L. B., Dias A. T., Friques A. G. F., Monteiro B. L., de Rezende L. C. D., Quinton L. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. 2019, Food chemistry, 282, 109-119.
- (37) Chakrabarti S., Guha S., Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. 2018, Nutrients, 10(11), 1738.
- (38) Minkiewicz P., Iwaniak A., Darewicz M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. 2019, International journal of molecular sciences, 20(23), 5978.
- (39) Nielsen S. D., Beverly R. L., Qu Y., Dallas D. C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. 2017, Food Chemistry, 232, 673-682.

- (40) Lacroix I. M., Meng G., Cheung I. W., Li-Chan E. C. Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? 2016, Journal of Functional Foods, 21, 87-96.
- (41) Otte J., Shalaby S. M., Zakora M., Nielsen M. S. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α-lactalbumin and β-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. 2007, International Dairy Journal, 17(12), 1460-1472.
- (42) Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. 2000, Journal of Dairy Research, 67(1), 53-64.
- (43) Tavares T. G., Contreras M. M., Amorim M., Martín-Álvarez P. J., Pintado M. E., Recio I., Malcata F. X. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. 2000, International Dairy Journal, 21(12), 926-933.
- (44) Pripp A. H., Isaksson T., Stepaniak L., Sørhaug T., Ardö Y. Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. 2005, Trends in Food Science & Technology, 16(11), 484-494.
- (45) Hrynkiewicz M., Iwaniak A., Bucholska J., Minkiewicz P., Darewicz M. Structure–Activity Prediction of ACE Inhibitory/Bitter Dipeptides—A Chemometric Approach Based on Stepwise Regression. 2019, Molecules, 24(5), 950.
- (46) FitzGerald R. J., Murray B. A., Walsh D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. 2004, The Journal of nutrition, 134(4), 980S-988S.
- (47) Vermeirssen V., van der Bent A., Van Camp J., van Amerongen A., Verstraete
 W. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting
 enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. 2004,
 Biochimie, 86(3), 231-239.
- (48) Saito K., Jin D.-H., Ogawa T., Muramoto K., Hatakeyama E., Yasuhara T., Nokihara K. Antioxidative Properties of Tripeptide Libraries Prepared by the Combinatorial Chemistry. 2003, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(12), 3668–3674.
- (49) Chan K. M., Decker E. A., Feustman C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. 1994, Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 34(4), 403-426.

ANEXOS



Figura 1. Representación de interacciones en 2D para la pose de docking seleccionada de P1. Figura generada con utilidad LigandInteractions, MOE.



Figura 2. Representación de interacciones en 2D para la pose de docking seleccionada de P2. Figura generada con utilidad LigandInteractions, MOE.



Figura 3. Representación de interacciones en 2D para la pose de docking seleccionada de P3. Figura generada con utilidad LigandInteractions, MOE.